

**Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-tehnološki fakultet**

Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija

Jasna Žibert
6984/PT

**Fenolni spojevi i antioksidacijska aktivnost lista tršlje (*Pistacia
lentiscus* L.).**

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Začinsko i aromatsko bilje

Mentor: doc. dr. sc. Ivona Elez Garofulić

Zagreb, 2018.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Preddiplomski sveučilišni studij Prehrambena tehnologija

Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo

Laboratorij za procese konzerviranja i preradu voća i povrća

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

Fenolni spojevi i antioksidacijska aktivnost lista tršlje (*Pistacia lentiscus* L.).

Jasna Žibert, 0058205934

Sažetak: Cilj ovog istraživanja bio je odrediti utjecaj vremena i lokacije berbe na udio ukupnih fenola i antioksidacijsku aktivnost u uzorcima lišća tršlje (*Pistacia lentiscus* L.). Istraživanje je provedeno na uzorcima koji su ubrani na lokacijama: Vela Luka, Lun, Barbariga i Hvar početkom svibnja i kolovoza 2017. godine. Maseni udjeli ukupnih fenola određivani su spektrofotometrijski primjenom Folin-Ciocalteu metode, dok je antioksidacijski kapacitet određivan FRAP metodom. Razlike u vrijednostima među lokacijama upućuju na mogući utjecaj faktora povezanih s okolišnim uvjetima na udio ukupnih fenola u biljci. Najveći udio od 104,02 mg GAE/g uzorka određen je u uzorku s Vela Luke, a u padajućem nizu slijede Lun, Hvar i Barbariga. Vrijeme berbe ne pokazuje značajan utjecaj na koncentraciju ukupnih fenola u lišću *P. lentiscus*. Pokazana je znatna antioksidacijska aktivnost lišća tršlje na svim lokacijama te najveća iznosi 444,30 mg AAE/g uzorka u uzorku s Barbarige dok je najmanja 284,69 mg AAE/g uzorka u uzorku s Vela Luke. Antioksidacijska aktivnost razlikuje se ovisno o vremenu berbe. Za sve lokacije osim Barbarige dolazi do pada u antioksidacijskom kapacitetu za berbu u kolovozu u usporedbi s berbom u svibnju. Rezultati upućuju da iako se sadržaj ukupnih fenola značajno ne mijenja, fenolni spojevi odgovorni za dobivene razlike u antioksidacijskom kapacitetu lišća tršlje se mijenjaju sa zrenjem biljke. Ispitana korelacija antioksidacijske aktivnosti sa sadržajem ukupnih fenola varira ovisno o vremenu berbe odnosno pokazana je vrlo dobra korelacija za prvi berbu, $r = 0,9526$, a slaba povezanost za drugu berbu, $r = 0,3547$.

Ključne riječi: fenoli, *P. lentiscus*, ultrazvuk, ekstrakcija, antioksidacijski kapacitet

Rad sadrži: 28 stranica, 8 slika, 5 tablica, 28 literaturnih navoda, 0 priloga

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: doc. dr. sc. Ivona Elez Garofulić

Pomoć pri izradi: mag. ing. Sanja Lončarić

Datum obrane: 09. srpnja, 2018.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
University undergraduate study Food Technology

Department of Food Engineering
Laboratory for Technology of Fruits and Vegetables Preservation and Processing

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Food Technology

Phenolic compounds and antioxidant activity of mastic leaf (*Pistacia lentiscus* L.).
Jasna Žibert, 0058205934

Abstract: The aim of this study was to determine effect of location and time of harvest on total phenolic content and antioxidant activity in *Pistacia lentiscus* L. leaves. The study was on samples from: Vela Luka, Lun, Barbariga and Hvar which were harvested at the beginning of May and August 2017. Total phenolic content was determined using Folin-Ciocalte reagent while antioxidant activity was evaluated using FRAP assay. Differences in results between locations indicate on possible environmental factors impacting on total phenolic content in the plant. The largest content was 104.02 mg GAE/g sample determined in samples from Vela Luka while in a descending matter Lun, Hvar and Barbariga follow. Time of harvest does not show a significant impact on total phenolic content in leaves of *P. lentiscus*. A significant antioxidant capacity is shown in samples from all locations and the largest is 444.30 mg AAE/g sample from samples from Barbariga while the smallest is 284.69 mg AAE/g sample from samples from Vela Luka. Antioxidant capacity differs in regards to the time of harvest. For all locations except Barbariga a decrease in antioxidant capacity is present. Results indicate that even with non-significant change in total phenolic content, phenolic compounds responsible for differences in antioxidant capacity are changing over the life span of the plant. Examined correlation of antioxidant capacity and total phenolic content varies depending on the time of harvest – very high correlation is shown for the first harvest, $r = 0.9526$, and low correlation for the second harvest, $r = 0.3547$.

Keywords: phenols, *P. lentiscus*, ultrasound, extraction, antioxidants capacity

Thesis contains: 28 pages, 8 figures, 5 tables, 28 references, 0 supplements

Original in: Croatian

Thesis is printed and electronic form deposited in the library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: Doc. PhD. Ivona Elez Garofulić

Technical support and assistance: mag. ing. Sanja Lončarić

Defence date: July 9th, 2018.

Sadržaj

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. MORFOLOŠKE KARAKTERISTIKE TRŠLJE (<i>P. LENTISCUS</i> L.)	2
2.2. FENOLNI SPOJEVI TRŠLJE	2
2.3. UTJECAJ LOKACIJE RASTA TRŠLJE NA NJEN FITOKEMIJSKI SASTAV	5
2.4. UTJECAJ VREMENA BERBE NA FITOKEMIJSKI SASTAV TRŠLJE.....	6
2.5. PRIMJENA EKSTRAKTA HERBE TRŠLJE	7
2.6. ANTIOKSIDACIJSKI KAPACITET FENOLNIH SPOJEVA TRŠLJE	8
2.6.1. Metode određivanja antioksidacijskog kapaciteta	10
3. MATERIJALI I METODE	11
3.1. MATERIJALI	11
3.2. METODE.....	11
3.2.1. Ekstrakcija fenolnih spojeva lista tršlje.....	11
3.2.1.1. Postupak pripreme ekstrakta	12
3.2.2. Određivanje ukupnih fenola	12
3.2.2.1. Princip određivanja	12
3.2.2.2. Postupak određivanja ukupnih fenola	13
3.2.2.3. Izrada baždarnog dijagrama	13
3.2.3. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta FRAP metodom.....	15
3.2.3.1. Princip određivanja	15
3.2.3.2. Postupak određivanja	16
3.2.3.3. Izrada baždarnog dijagrama	17
4. REZULTATI I RASPRAVA	19
5. ZAKLJUČAK	24
6. LITERATURA	25

1. Uvod

Tršlja (*Pistacia lentiscus* L.) je samonikla biljka karakteristična za Mediteransko područje, a najčešće se može pronaći na pretežito suhom i neplodnom tlu priobalnog područja Španjolske, Italije, Hrvatske, Grčke te Tunisa, Alžira i Izraela. Već od davnina poznata su ljekovita svojstva tršlje koja se pripisuju brojnim bioaktivnim spojevima koji su sadržani u listu ili bobicama, a koji se najčešće primjenjuju u obliku etanolnih ili vodenih ekstrakata. Ekstrakti se mogu pripremati iz cijelih mladih stabljika, lišća ili bobica primjenom različitih otapala (najčešće voda, etanol ili vodene otopine etanola) ovisno o krajnjoj namjeni. Vodeni ekstrakti lišća i mladih stabljika pripremaju se kao infuzije ili kao dekokti, a dokazano je da imaju antimikrobna, antifungalna, protuupalna svojstva te potencijalno antikancerogeno djelovanje. Ekstrakti tršlje se upotrebljavaju za liječenje želučanih čireva, ekcema, probavnih smetnji i infekcija ždrijela (Yemmen i sur., 2015), ispiranje usne šupljine, liječenje mikotične infekcije tjemena (Landau i sur., 2014). Također je potvrđeno da etanolni ekstrakti lišća tršlje (*P. Lentiscus*) imaju potencijanu primjenu u prevenciji hiperkolesterolemije (Cheurfa i sur., 2015) te hepatoprotektivno djelovanje u prevenciji nekroze jetre uslijed štetnog djelovanja paracetamola (Mehenni i sur., 2016). Navedeni biopotencijal tršlje povezuje se kemijskim sastavom i prisutnosti bioaktivnih spojeva iz skupine fenola i terpena, od kojih mnogi pokazuju i antioksidativno djelovanje. Fenolni spojevi tršlje najvećim dijelom pripadaju skupini flavonoida i derivata hidroksibenzojeve kiseline, a od njih dominiraju flavanoli poput katehina i epikatehina te galna kiselina i njeni esteri. Udio fenolnih spojeva tršlje značajno varira u ovisnosti o dijelu biljke, ali i o lokacijama te terminima berbe. U usporedbi s cvijetom list tršlje sadržava veći udio ukupnih fenola (Botsaris i sur., 2015) dok je sam cvijet kao i plod bogat na terpenima (Landau i sur., 2014). Uslijed starenja biljke odnosno njenim zrenjem sukladno se mijenja i njen kemijski sastav. Razlike u udjelu ukupnih fenola zamijećene su analiziranjem tršlje ubrane u fazi prije i tijekom cvjetanja te prema Gardeli i sur. (2008) udio ukupnih fenola raste prijelazom biljke u stadij cvjetanja. Kao samonikla biljka, tršlja je rasprostranjena po obalnom području Mediterana i iako taj zahvaćeni pojas karakterizira specifična klima, razlike u okolišu (tip i salinitet tla) i varijacije u klimatskim uvjetima (temperatura, količina padalina, broj sunčanih sati) među područjima dovode do razlika u kemijskom sastavu tršlje (Landau i sur., 2014). Tršlja je još uvijek nedovoljno istražena, naročito tršlja s područja Republike Hrvatske. Stoga je cilj ovog istraživanja odrediti udio ukupnih fenola u etanolnom ekstraktu lišća i odrediti kako on korelira s antioksidacijskom aktivnošću te usporediti utjecaj lokacije i vremena berbe na promatrane parametre.

2. Teorijski dio

2.1. Morfološke karakteristike tršlje (*P. lentiscus* L.)

Tršlja (*Pistacia lentiscus* L.) je biljka iz porodice *Anacardiaceae*, a u prirodi raste samoniklo kao zimzeleni grm od 1 do 5 metara visine, specifičan za priobalno Mediteransko područje. Raste na predjelima ispod 1100 metara nadmorske visine, na sunčanim i suhim mjestima stjenovitih područja. Lišće je izduženog, ovalnog oblika, oko 5 cm dužine, a cvijeta od sredine ožujka do kraja svibnja. Cvjetovi su mali, raspoređeni u gustim cvatovima, s tim da su muški cvjetovi crvene boje dok su ženski žute. Bobice (plod) su sitne, okruglastog oblika, crvene boje, a zreli plodovi su crne boje, promjera oko 4 mm (Landau i sur., 2014).



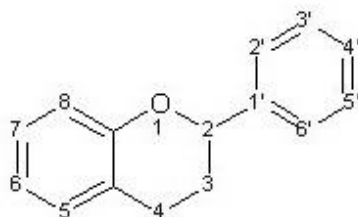
Slika 1. Tršlja (Landau i sur., 2014)

2.2. Fenolni spojevi tršlje

Kao sekundarni biljni metaboliti, fenolni spojevi sintetiziraju se u biljci kao odgovor na okolišne i fiziološke stresove poput napada patogena i insekata, UV zračenja i samog oštećenja biljnog materijala (Khoddami i sur., 2013). Sintetiziraju se iz fenilalanina ili u manjoj mjeri iz tirozina (Shahidi i Naczek, 2001).

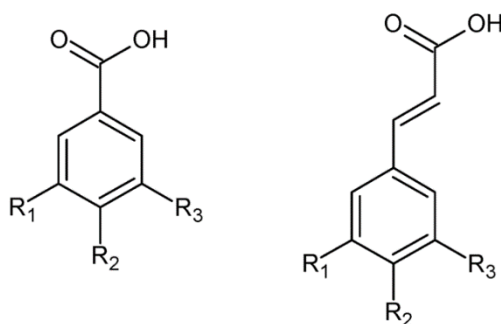
Fenolni spojevi po svojoj kemijskoj strukturi sadržaju barem jedan benzenski prsten s jednom ili više hidroksilnih skupina. Dijelimo ih na flavonoide (flavanoli, flavonoli, flavoni, izoflavoni, flavanoni, antocijani), fenolne kiseline (hidroksicimetna i hidroksibenzojeva kiseline i njihovi derivati) i neflavonoidne komponente (lignani, stilbeni, kumarini, hidrohalkoni). Češće su prisutni u formi glikozida nego kao aglikoni (Duračkova, 2014).

Flavonoidi su C6-C3-C6 strukture (Slika 1.) odnosno sadrže difenilni propanski kostur kojeg čine kondenzirani benzenski i piranski prsten (piranska jezgra) i nekondenzirani benzenski prsten povezan s piranskim.



Slika 2. Osnovna kemijska struktura flavonoida (Shahidi i Nacz, 2004)

Od fenolnih kiselina razlikujemo hidroksicimetne i hidroksibenzojeve kiseline, a u prirodi su nađeni njihovi brojni derivati. Razlike u kemijskoj strukturi prikazanoj Slikom 2 za hidroksibenzojeve i hidroksicimetne kiseline proizlaze iz stupnja hidroksilacije i metilacije spojeva. Na benzenski prsten vezani su supstituenti poput hidroksilne i metoksilne skupine ovisno o derivatu. Jedan od primjera derivata hidroksibenzojeve kiseline, ujedno i identificiran u tršlji, je galna kiselina (3,4,5-trihidroksibenzojeva kiselina), a derivati hidroksicimetne kiseline su primjerice p-kumarinska i kafeinska kiselina.



Slika 3. Osnovna struktura hidroksibenzojeve kiseline (lijevo) i hidroksicimetne kiseline (desno) (Shahidi i Nacz, 2004)

Brojni znanstveno-istraživački radovi uspoređujući fitokemijski sastav pojedinih nadzemnih dijelova biljke tršlje navode list kao komponentu bogatijom ukupnim fenolima dok se bobica navodi kao bogatija terpenima (Landau i sur., 2014). U tablici 1 navedeni su udjeli ukupnih fenola, flavonoida i hidroliziranih tanina u nadzemnim dijelovima biljke (list, cvijet i stabljika) i podzemnim (korijen). List sadržava najveći udio svih određivanih skupina fenolnih spojeva te ukupnih fenola, dok plod i korijen npr. sadrže manje udjele flavonoida i hidroliziranih tanina (Zitouni i sur., 2016).

Tablica 1. Usporedba sadržaja ukupnih fenola, kondenziranih tanina i flavonoida u metanolnim ekstraktima različitih dijelova biljke *P. lentiscus* (Nedroma, Alžir) (Zitouni i sur., 2016)

Dio biljke	Ukupni fenoli (mg GAE/g suhe tvari)	Kondenzirani tanini (mg CE/g suhe tvari)	Flavonoidi (mg CE/g suhe tvari)
List	216,289 ± 20,62	121,515 ± 9,171	19,162 ± 0,436
Stabljika	121,399 ± 3,354	80,215 ± 3,113	16,788 ± 0,733
Plod	103,342 ± 2,317	7,893 ± 0,481	4,696 ± 0,329
korijen	30,188 ± 1,291	7,166 ± 0,818	4,287 ± 0,106

CE = *cathehin equivalent*, ekvivalent katehina

GAE = *gallic acid equivalent*, ekvivalent galne kiseline

Identificirane fenolne komponente u lišću tršlje pripadaju flavonoidima i derivatima fenolnih kiselina. Od flavonoida se u većoj koncentraciji navode spojevi koji pripadaju flavan-3-olima (katehin, epikatehin), flavonolima (kvercetin-3-glukozid) te u manjoj koncentraciji antocijani (cijanidin-3-O-glukozid i delphinidin-3-O-glukozid), a od fenolnih kiselina u najvećoj mjeri su prisutni derivati hidroksibenzojeve kiseline i to galna kiselina i njeni metilni esteri (3,4,5-tri-O-galolililina kiselina, β -glukogalin) (Bozorgi i sur., 2013).

Missoun i suradnici (2017) među identificiranim komponentama navode flavonoide, alkaloida, saponine, tanine, glikozide, terpenoide i steroide u lišću i stabljici *P. lentiscus* koja potječe iz zapadnog Alžira. Rodriguez-Perez (2013) i suradnici u najvišim koncentracijama navode miricetin glukozid, katehin, β -glukogalin i kvercetin galat.

Pridodana svojstva (poput protuupalnog, antimikrobnog itd.) proizlaze iz fenolnog profila lista tršlje kojeg su Mehenni i suradnici (2016) odredili HPLC-DAD analizom. Dobiven je visok udio galne kiseline (161,67 ± 35,27 mg/g s.tv.) iza koje slijedi katehin (31,79 ± 5,76 mg/g

s.tv.), siringinska ($52,66 \pm 7,23$ mg/g s.tv.) te elaginska kiselina ($9,54 \pm 0,63$ mg/g s.tv.), fenolni spojevi od prije poznatog visokog antioksidacijskog kapaciteta koji proizlazi iz njihove kemijske strukture.

Kvantitativna analiza fenolnih komponenata u etil-acetatnom ekstraktu lista tršlje s područja Nedroma, Alžir također je pokazala prisutnost askorbinske kiseline ($118,41$ µg/g suhe tvari), *p*-kumarinske kiseline ($131,90$ µg/g suhe tvari), ferulinske kiseline ($91,23$ µg/g suhe tvari), kvercetina ($1945,45$ µg/g suhe tvari) i naringinina ($1652,04$ µg/g suhe tvari) (Zitouni i sur., 2016).

2.3. Utjecaj lokacije rasta tršlje na njen fitokemijski sastav

Udio fenolnih spojeva lista tršlje varira ovisno od kuda biljka potječe, no HPLC analizama utvrđena je prisutnost istih spojeva neovisno o regiji rasta. Tako, prikazano tablicom 2, istraživanja provedena u Italiji, Izraelu i Alžiru navode hidrolizirane tanine, flavonol glukozide i glukozide miricetina, cijanidina i kvercetina kao prisutne sastavnice nađene u listovima tršlje. Kao najzastupljenije komponente navode se katehin i galna kiselina.

Tablica 2. Sadržaj fenola (mg/g suhe tvari) u listovima tršlje ubranim u Italiji, Izraelu i Alžiru određen HPLC analizom (Landau i sur., 2014)

Kemijski spoj	Izrael	Italija	Alžir
Hidrolizirani tanini	26,7	37,0	-
Katehin	5,7	1,8	3,4
Klorogenska kiselina	17,5	-	-
Galna kiselina	1,22	3,7	0,3
Cijanidin-3-O-glukozid	-	0,4	-
Miricetin-3-O-rutinozid	6,8	4,5	-
Miricetin-3-O-ramnozid	-	-	6,2
Kvercetin-3-O-rutinozid	13,6	-	-
Kvercetin-3-O-ramnozid	-	3,7	-

Okolišni faktori koji utječu na rast i razvoj te posljedično i njen fitokemijski sastav uključuju tip tla na kojem biljka uspijeva, količinu padalina, temperaturu, salinitet, broj sunčanih sati i dr..

Tip tla na kojemu biljka raste utječe na njen konačan fitokemijski sastav što Llorens-Molina i suradnici (2015) pokazuju u istraživanju sastava eteričnih ulja dobivenih iz lišća tršlje ubranog s dva različita tipa tla u Valenciji, Španjolskoj, a veoma sličnih drugih klimatskih uvjeta. Uočene su razlike u prevladavajućim komponentama esencijalnog ulja, terpenima te u silikatnom tlu prevladavaju seskviterpeni (39,9 %) dok u vapnenom tlu prevladavaju monoterpeni (57,5 %) (Llorens-Molina i sur., 2015).

Količina padalina pokazala se kao faktor koji je utjecao na fitokemijski sastav analiziranih eteričnih ulja dobivenih iz lišća sa tri lokacije u Tunisu u istraživanju Bachrouch i suradnika (2013). Područja s kojeg potječe analizirano lišće kategorizirana su na vlažno, poluvlažno i polusuho te je pokazano da je najsuše područje rezultiralo najvećim udjelom monocikličkog monoterpena limonena te bicikličkih monoterpena α -pinena i α -felandrena, a najvlažnije s najvećim udjelom seskviterpena β -kariofilena dok kod poluvlažnog prevladavaju monociklički monoterpeni terpinen-4-ol i α -terpineol.

Salinitet je jedan od većih abiotičkih stres faktora koji utječe na rast i reproduktivnost biljke. Poznato je da je tršlja rasprostranjena po pretežno suhom i toplom Mediteranskom području te da je stoga adaptirana na neplodna tla i ekstremne vremenske uvjete poput dugih razdoblja suše. Cristiano i suradnici (2016) u svojem istraživanju promatrali su utjecaj saliniteta na fiziologiju tršlje u kontroliranim uvjetima. Osim što je porast saliniteta utjecao na smanjenje vrijednosti promatranih morfoloških i fizioloških parametara (visina biljke, broj listova na stabljici, duljina korijena, ukupna biomasa) pokazalo se da je tršlja izrazito prilagodljiva biljka koja može tolerirati i akumulirati sol pri visokim koncentracijama stoga je njen uzgoj potencijalno pogodan za obnavljanje napuštenih (uslijed nepogodnog saliniteta tla) agrokulturnih područja.

2.4. Utjecaj vremena berbe na fitokemijski sastav tršlje

Uz uvjete okoliša vezanih za lokaciju biljke, vrijeme berbe također utječe na kemijski sastav određen iz ekstrakta lišća tršlje. S razvitkom biljke odnosno s njenim zrenjem sukladno se mijenja i njen kemijski sastav te je za očekivati da će dobivene vrijednosti varirati ovisno o starosti biljke koja se analizira. U tablici 3 je prikazana jedna takva usporedba udjela ukupnih fenola i ispitan je antioksidacijski kapacitet FRAP metodom ovisno o dobu godine kada je biljka ubrana.

Tablica 3. Sadržaj ukupnih fenola i antioksidacijski kapacitet određen FRAP metodom u metanolnim ekstraktima lišća tršlje u tri termina berbe (Gardeli i sur., 2008)

Vegetativno stanje	Vrijeme berbe	Ukupni fenoli (mg GAE/g osušenog lista)	FRAP (mmol Fe ²⁺ /L biljnog ekstrakta)
Prije cvjetanja	Veljača	483 ± 2,7	84,6 ± 3,5
Cvjetanje	Svibanj	588 ± 32,7	131,4 ± 10,1
Formiranje ploda	Kolovoz	581 ± 14,0	105,0 ± 12,2

Prema Gardeli i suradnicima (2008) tršlja s otoka Zakynthos, Grčka sadržava najviše monoterpena koji dosežu svoju maksimalnu koncentraciju u fazi cvjetanja ujedno kada je uočen i najveći udio ukupnih fenola (588 ± 32,7 mg GAE/g uzorka) i najviši antioksidacijski kapacitet određen FRAP metodom (131,4 ± 10,1 mmol Fe²⁺/L). S obzirom na korelaciju dobivenih vrijednosti udjela ukupnih fenola i AO kapaciteta autori navode da rezultati upućuju da je tršlja potencijalan prirodan izvor antioksidansa.

2.5. Primjena ekstrakta herbe tršlje

Proveden je određeni broj istraživanja na temelju kojih se može zaključiti da je tršlja bogat izvor bioaktivnih spojeva kojima se pripisuju različita pozitivna djelovanja u prevenciji nekih oboljenja. Prema jednom od provedenih *in vitro* istraživanja utvrđeno je da bioaktivni spojevi metanolnog ekstrakta lišća tršlje (iz područja sjevernog Tunisa) imaju potencijal u prevenciji pa djelomično i liječenju karcinoma debelog crijeva. U spomenutom istraživanju navodi se da bioaktivni spojevi ekstrakta lista tršlje uzrokuju apoptozu stanica karcinoma debelog crijeva (Yemmen i sur., 2015).

Catalani i sur. (2017) proveli su istraživanje utjecaja eteričnog ulja proizvedenog iz herbe tršlje koja potječe sa Sardinije, Italije na stanice raka. Na temelju provedene GG-MS analize kao glavne sastavnice identificirani su monoterpeni mircen i α -pinen, za koje se smatra da su odgovorne za antikancerogeno djelovanje.

Osim antikancerogenog djelovanja u jednom dijelu istraživanja navodi se antibakterijska aktivnost nadzemnih dijelova biljke *P. Lentiscus*. Analiziranjem djelotvornosti dekokta pripremljenog od lišća tršlje (iz područja zapadnog Alžira) na rast bakterija uočena je izrazita

antibakterijska aktivnost prema Gram pozitivnoj bakteriji *S. aureus* te inhibicija rasta Gram negativne *E. coli* (Missoun i sur., 2017). Slabije izraženu antibakterijsku aktivnost pokazuje vodeni ekstrakt lišća. Aiche i suradnici (2015) uspoređuju veličine zona rasta različitih bakterija te je pokazana najizraženija inhibicija rasta bakterija *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus aureus* te *Bacillus cereus*.

S obzirom na pokazanu antibakterijsku aktivnost tršlje Botsaris i suradnici (2015) pokazali su potencijalnu primjenu ekstrakta lišća tršlje kao konzervansa u hrani. Ekstrakt lišća tršlje bio je dio smjese za svježju svinjsku kobasicu koja je potom skladištena na 4 °C. U usporedbi s kontrolnim uzorkom, uzorak koji je sadržavao ekstrakt lišća tršlje pokazao je dulju mikrobiološku ispravnost te je zaključeno da je ekstrakt lišća tršlje potencijalan konzervans u mesnatim proizvodima. Također je zaključeno da pokazana inhibicija lipidne oksidacije proizlazi iz antioksidacijskog kapaciteta polifenolnih spojeva prisutnih u ekstraktu.

2.6. Antioksidacijski kapacitet fenolnih spojeva tršlje

Slobodni radikali kao vrlo reaktivne čestice zbog prisustva nesparenog elektrona u svojoj konfiguraciji ulaze u reakcije s drugim molekulama ili kao oksidansi oksidirajući molekulu s kojom su u reakciji čime se sami reduciraju ili kao reducensi prilikom čega elektron akceptorska molekula postaje reducirana čime se stvara potencijal za daljnje odvijanje lančane reakcije.

Slobodni radikali zaslužni su za proces starenja, kancerogeneze te brojne neurodegenerativne i endokrine bolesti, ali imaju i ulogu u imunološkim mehanizmima i kemijskoj signalizaciji u tijelu. Iako u tijelu imaju ključnu ulogu u staničnim procesima, slobodni radikali u određenim okolnostima su štetni za stanicu.

Oksidativni stres definiran je kao narušena ravnoteža između prisutnih antioksidansa i slobodnih radikala. Narušavanjem ravnoteže između slobodnih radikala i antioksidansa dovodi do oksidativnih promjena na proteinima, lipidima i nukleinskim kiselinama (Chabert i sur., 2014).

U slučaju suvišne produkcije slobodnih radikala odnosno u stanju narušene oksidativne ravnoteže, organizam posjeduje nekoliko mehanizama obrane od štetnog djelovanja slobodnih radikala. Jedan od njih je mehanizam djelovanja antioksidansa.

Antioksidansi su molekule koje prevode molekule slobodnih radikala u neradikalne i netoksične metabolite. Osim endogenih antioksidansa u organizam je moguće unijeti egzogene antioksidanse putem hrane poput askorbinske kiseline i β -karotena (Duračkova, 2014).

Dobrobit od konzumacije hrane biljnog podrijetla poput voća i povrća većim dijelom se povezuje sa prisutnošću fenolnih spojeva. Zdravstvena dobrobit polifenola povezana je s njihovom antioksidacijskom i antiupalnom aktivnošću. Njihova svojstva proizlaze iz njihove kemijske strukture odnosno zbog prisutnosti hidroksilnih skupina te konjugirane dvostruke veze u benzenskom prstenu. Fenolni spojevi kao antioksidansi djeluju na prevenciju srčanih bolesti, smanjenje upalnih procesa, smanjuju mogućnost pojave karcinoma i dijabetesa te smanjuju učestalost pojave mutageneze u ljudskim stanicama (Khoddami i sur., 2013).

Povezanost udjela ukupnih fenola s antioksidacijskom aktivnošću pokazana je u nekoliko istraživačkih radova. Tako Hamiani i suradnici (2016) u svom istraživanju navode da sposobnost reduciranja DPPH radikala raste s porastom koncentracije ulja lišća tršlje. Gardeli i suradnici (2008) u svom istraživanju pokazali su da je udio ukupnih fenola povezan s antioksidacijskom aktivnošću odnosno da smanjenje udjela ukupnih fenola prati smanjenje antioksidacijske aktivnosti. Za berbu u svibnju autori navode antioksidacijsku aktivnost od $131,4 \pm 10,1$ mmol Fe^{2+}/L dok je za berbu u kolovozu antioksidacijska aktivnost bila $105,0 \pm 12,2$ mmol Fe^{2+}/L .

Značajnost tršlje proizlazi iz njene značajne antioksidacijske aktivnosti. U istraživanju Bozorgi i suradnika (2013) antioksidacijska aktivnost lista tršlje određena je FRAP metodom, a ona se kreće od $84,6$ mmol Fe^{2+}/L do $131,4$ mmol Fe^{2+}/L . Na temelju dobivenih vrijednosti autori zaključuju da tršlja kao biljka visokog antioksidacijskog kapaciteta je dobar prirodan izvor antioksidansa.

Iako je list čest subjekt znanstvenih radova s obzirom na pokazanu antioksidacijsku aktivnost, i drugi dijelovi biljke poput ploda pokazuju određeni stupanj antioksidacijskog kapaciteta. U jednom takvom istraživanju navodi se da se antioksidacijska aktivnost određena DPPH metodom za plodove kreće od $70,2 \pm 5,3$ mg TE (Troloks ekvivalenta)/g ekstrakta do $387,6 \pm 16,8$ mg TE/g ekstrakta, a za list od $123,9 \pm 7,7$ mg TE/g ekstrakta do $510,3 \pm 6,6$ mg TE/g ekstrakta. U istom istraživanju antioksidacijska aktivnost određena je ABTS metodom i FRAP metodom te koristeći ABTS metodu ona se za plodove se kretala od

21,3 ± 7,3 mg TE/g ekstrakta do 290,2 ± 28,1 mg TE/g ekstrakta, a za list od 92,4 ± 3,9 mg TE/g ekstrakta do 384,6 ± 6,7 mg TE/g ekstrakta. FRAP metodom dobivena je antioksidacijska aktivnost od 42,2 ± 2,4 mg TE/g ekstrakta, a za plodove te 518,8 ± 37,2 mg TE/g ekstrakta. S obzirom na dobivene vrijednosti antioksidacijske aktivnosti autori navode važnost tršlje kao prirodnog izvora antioksidansa (Botsaris i sur., 2015).

Istraživanja ukazuju da su za postizanje antioksidacijskog učinka *in vitro* potrebne izrazito visoke koncentracije antioksidansa nego što je to moguće postići *in vivo* zbog njihove ograničene biodostupnosti i slabe apsorpcije u organizmu. Stoga se smatra da je njihov fiziološki učinak ograničen (Chabert i sur., 2014).

2.6.1. Metode određivanja antioksidacijskog kapaciteta

Određivanje antioksidacijskog kapaciteta odabranog biljnog materijala provodi se korištenjem više metoda radi utvrđivanja njegove točnosti. Generalno se metode mogu podijeliti u dvije velike grupe: metode koje se temelje na transferu elektrona u redoks reakciji antioksidansa i oksidansa što se očituje promjenom boje reakcijske smjese (SET, *single electron transfer capacity*) i metode bazirane na transferu hidrogen atoma u praćenoj reakciji (HAT, *hydrogen atom transfer*) (Chabert i sur., 2014). Neke od metoda koje pripadaju HAT grupi su ORAC (*Oxygen radical absorbance capacity*) i ABTS metoda. ABTS metoda bazira se na redukciji ABTS radikal-kationa (2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina) u prisutnosti antioksidansa pri čemu dolazi do smanjenja vrijednosti apsorbanije ABTS radikala što je vidljivo i iz gubitka boje otopine reakcijske smjese (Pisoschi i Negulescu, 2011). ORAC metoda bazira se na mjerenju gubitka fluorescentnosti uslijed raspada molekule AAPH (2,2'-azobis-2-amidinopropan) djelovanjem peroksidnog radikala. Raspad AAPH molekule sprječava se prisutnošću antioksidansa u reakcijskoj smjesi odnosno gubitak fluorescentnosti je manje izražen što je više antioksidansa prisutno (Huang i sur., 2005). SET grupi pripadaju FRAP (*Ferric reducing antioxidant power*) i DPPH metoda. DPPH metoda bazira se na reakciji antioksidansa i DPPH (2,2-difenil-1-pikril-hidrazil) radikala pri čemu dolazi do redukcije DPPH• u DPPH što prati gubitak intenziteta ljubičaste boje reakcijske smjese koji se mjeri spektrofotometrijski pri apsorpcijskom maksimumu na 520 nm. (Pisoschi i Negulescu, 2011). FRAP metoda koja je ujedno i korištena u ovom radu bazira se na sposobnosti antioksidansa da reducira trovalentno željezo u dvovalentno pri čemu dolazi do stvaranja plave boje reakcijske smjese čiji intenzitet direktno ovisi o količini reduciranog željeza (Chabert i sur., 2014).

3. Materijali i metode

3.1. Materijali

Istraživanje je provedeno na listovima tršlje (*Pistacia lentiscus* L.) koji su ubrani početkom svibnja te početkom kolovoza 2017. godine, na četiri lokacije: Lun (44,683128 / 14,754214), Hvar (43,130962/16,942946), Barbariga (44,991008/13,736675) i Vela Luka (42,961182/16,721574). Uzorci su, nakon branja sušeni u prozračnom i sjenovitom prostoru bez direktnog utjecaja sunca pri sobnoj temperaturi tijekom 5 dana. Nakon 5 dana, osušeni listovi tršlje su samljeveni, stavljani u plastične posudice s čepom, te skladišteni na 4°C do provedbe analize.

3.2. Metode

3.2.1. Ekstrakcija fenolnih spojeva lista tršlje

Postupak ekstrakcije provodi se primjenom vodene otopine etanola (70%, v/v) s ciljem bolje ekstrakcije fenolnih spojeva iz biljnog materijala. Prema dosadašnjim istraživanjima bolji prinosi fenolnih spojeva postižu se primjenom binarnih sustava otapala što je i u ovom istraživanju primijenjeno. Za dodatno povećanje prinosa fenolnih spojeva ekstrakcija je provedena uz primjenu ultrazvučne kupelji.

Aparatura i pribor

- Analitička vaga (Ohaus, AX224, Ohaus corporation)
- Ultrazvučna kupelj (Bandelin Sonorex, RK 100 H, Bandelin electronic)
- Vodena kupelj (Heating Bath, B-490, Buchi)
- Vortex
- Staklene epruvete
- Odmjerene tikvice volumena 50 mL
- Stakleni lijevak
- Filter papir

Kemikalije

Etanol, 96 %-tni (Gram Mol)

Etanol (70 %-tni)

Priprema: Za pripremu 500 mL 70 %-tne otopine etanola otpipetira se 364,58 mL 96 %-tnog etanola.

3.2.1.1. Postupak pripreme ekstrakta

U Erlenmeyerovu tikvicu odvaži se 1g uzorka s točnošću $\pm 0,0001$ g i doda se 40 mL vodene otopine etanola (70%-tni). Sadržaj se ekstrahira pomoću ultrazvučne kupelji na 40 kHz pri 50°C 20 minuta. Preko filter papira sadržaj Erlenmeyerove tikvice profiltrira se u odmjernu tikvicu od 50 mL koja se potom nadopuni do oznake sa 70%-tnom otopinom etanola.

3.2.2. Određivanje ukupnih fenola

3.2.2.1. Princip određivanja

Određivanje ukupnih fenola provodi se spektrofotometrijski koristeći Folin Ciocalteu reagens, smjesu fosforwolframove i fosformolibdenske kiseline koje u blago lužnatim uvjetima u reakciji s fenolnim spojevima djeluju kao oksidansi, a pritom se reduciraju u wolframov oksid i molbidenov oksid koji su plavo obojeni. Intenzitet plavog obojenja mjeri se spektrofotometrijski na valnoj duljini 765 nm, a on je veći što je u otopini prisutno više hidroksilnih skupina koje su reagirale s Folin Ciocalteu reagensom odnosno što je koncentracija ukupnih fenola veća. Rezultat je izražen u mg ekvivalenta galne kiseline (GAE) po gramu uzorka.

Aparatura i pribor

- Spektrofotometar (VWR UV-1600PC Spectrophotometer)
- Analitička vaga (Ohaus, AX224, Ohaus corporation)
- Vodena kupelj (Heating Bath, B-490, Buchi)
- Vortex
- Staklene kivete
- Staklene epruvete
- Pipete

- Propipeta
- Odmjerne tikvice od 100 mL

Kemikalije

Folin-Ciocalteu reagens (Fisher Scientific, Velika Britanija)

Zasićena otopina natrijeva karbonata (20%-tna)

Priprema: 200 g anhidrida natrijeva karbonata (Gram-mol, Hrvatska) otopi se u 800 mL vruće destilirane vode i ohladi na sobnu temperaturu te se doda nekoliko kristalića natrijeva karbonata, nadopuni u odmjerne tikvici od 1000 mL i nakon 24 sata filtrira.

Standard galne kiseline (Sigma, Njemačka)

3.2.2.2. Postupak određivanja ukupnih fenola

Neposredno prije mjerenja pripremljeni ekstrakt razrijedi se 10 puta koristeći otapalo za ekstrakciju (70 %-tni etanol). U staklenu epruvetu redom se otpipetira 100 μ L razrijeđenog ekstrakta, 200 μ L Folin Ciocalteu reagensa i 2 mL destilirane vode te nakon 3 minute 1 mL zasićene otopine natrijeva karbonata. Sadržaj epruvete promiješa se pomoću Vortexa te potom termostatira 25 minuta pri $T=50^{\circ}\text{C}$. Na spektrofotometru se mjeri apsorbancija pri valnoj duljini 765 nm. Slijepa proba pripremi se na isti način, ali umjesto ekstrakta uzima se ista količina otapala za ekstrakciju (70 %-tna otopina etanola).

3.2.2.3. Izrada baždarnog dijagrama

Odabrana metoda bazira se na spektrofotometrijskom određivanju koristeći vanjski standard. U ovom slučaju korišten je standard galne kiseline, a baždarni dijagram prikazuje ovisnost izmjerene apsorbacije i otopina galne kiseline 5 različitih koncentracija.

Izrada baždarnog dijagrama

500mg galne kiseline otopi se u 10 mL 96 %-tnog etanola i prenese se u odmjernu tikvicu od 100 mL koja se nadopuni destiliranom vodom do oznake.

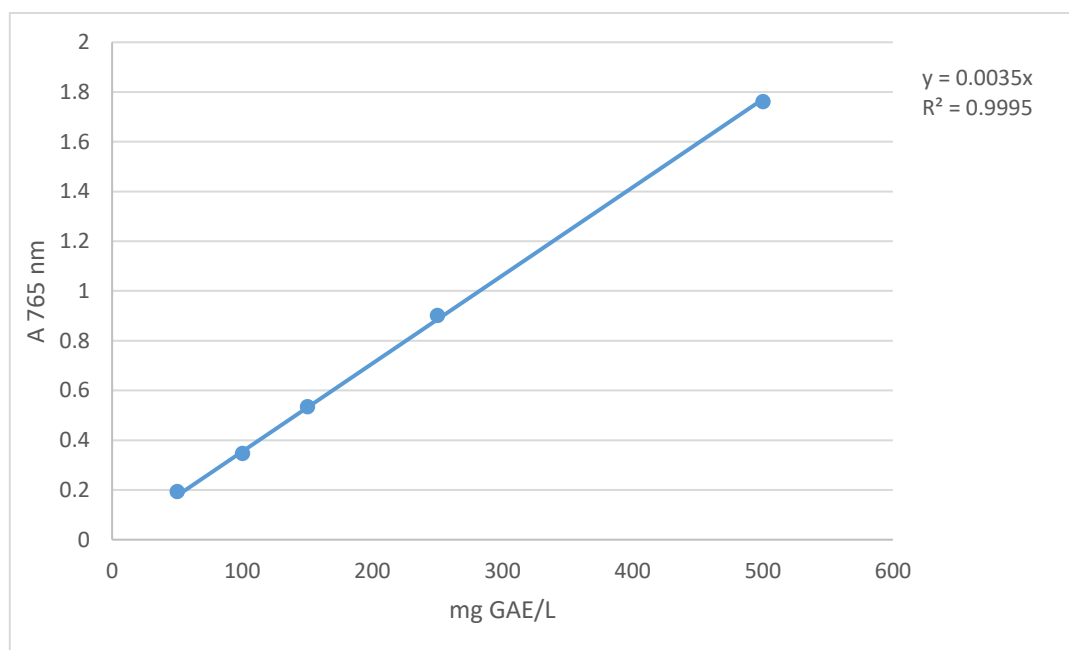
U odmjerne tikvice od 100 mL redom se otpipetira 1, 2, 3, 5 i 10 mL alikvota pripremljene standardne otopine galne kiseline i potom se nadopunjavaju destiliranom vodom do oznake.

Koncentracije galne kiseline u tikvicama redom iznose 50, 100, 150, 250 i 500 mg/L. Iz svake tikvice otpipetira se 100 μ L otopine standarda u epruvete. Potom se dodaje 200 μ L Folin Ciolcalteu reagensa, 2 mL destilirane vode i nakon 3 minute 1 mL zasićene otopine natrijeva karbonata. Epruvete se promiješaju na Vortexu te termostatiraju 25 minuta pri $T=50\text{ }^{\circ}\text{C}$ u kupelji od rotavatora. Za pripremu slijepe probe postupak je isti osim što se umjesto standarda galne kiseline uzima 100 μ L destilirane vode. Apsorbancija se mjeri pri valnoj duljini 765 nm, a dobivene vrijednosti prikazane su u Tablici 4.

Tablica 4. Izmjene apsorbancije pri 765 nm za standardne otopine galne kiseline pri danim koncentracijama

mg/L	A 765 nm
50	0,194
100	0,347
150	0,535
250	0,902
500	1,761

Baždarni pravac predstavlja ovisnost izmjerenih vrijednosti apsorbancije pri 765 nm o poznatih koncentracija standardnih otopina galne kiseline (slika 4).



Slika 4. Baždarni dijagram za ukupne fenole

Koncentracija ukupnih fenola u traženim uzorcima izračuna se uvrštavanjem u jednadžbu baždarnog pravca:

$$y = 0,0035 \cdot x$$

gdje je:

y – apsorbancija pri 765 nm,

x – koncentracija ukupnih fenola (mg GAE/L)

R² – koeficijent determinacije

3.2.3. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta FRAP metodom

3.2.3.1. Princip određivanja

Određivanje antioksidacijske kapaciteta FRAP metodom bazira se na reakciji redukcije žuto obojenog kompleksa željezo-2,4,6-tripiridil-s-triazin (TPTZ) pri čemu nastaje plavo obojeni kompleks fero-tripiridiltriazin koji ima apsorpcijski maksimum pri 593 nm. Reakcija se odvija u kiselom mediju pH 3,6 čime se osigurava dobra topljivost željeza i niži ionizacijski potencijal koji omogućuje prijenos elektrona, a ujedno povećava i redoks potencijal (koji dodatno omogućava pomak reakcije u smjeru prijenosa elektrona). Redoks potencijal reakcije Fe(III)/Fe(II) iznosi 0,77 V pa će svi spojevi s nižim redoks potencijalom ulaziti u reakciju redukcije željeza i tako doprinijeti rezultatu antioksidacijskog kapaciteta. Reakcija traje 4 do 6 minuta stoga se može koristiti za opisivanje antioksidacijskog kapaciteta onih fenolnih spojeva koji ulaze u reakciju veoma brzo dok za spojeve s dužim vremenskim pomakom u mehanizmu djelovanja ova metoda nije prikladna. FRAP vrijednosti u ovom slučaju izražavaju se preko askorbinske kiseline.

Aparatura i pribor

- Spektrofotometar (VWR UV-1600PC Spectrophotometer)
- Staklene kivete
- Analitička vaga (Ohaus, AX224, Ohaus corporation)
- Mikropipete
- Staklene epruvete
- Staklene pipete
- Odmjerne tikvice

- Vortex
- Plastična lađica za vaganje
- Stakleni lijevak

Kemikalije

Klorovodična kiselina (37%-tna) (Carlo Erba reagents)

Klorovodična kiselina, 40 mM

Priprema: U odmjernu tikvicu od 100 mL otpipetira se 300 μ L 37%-tne klorovodične kiseline i nadopuni destiliranom vodom.

TPTZ (2, 4, 6-tripiridil-s-triazin), 10 mM

Priprema: U plastičnu lađicu odvaži se 0,0311 g TPTZ (Sigma-aldrich) i kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu od 10 mL i nadopuni do oznake s 40 mM klorovodičnom kiselinom.

Željezo (III)-klorid heksahidrat ($\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$), 20 mM

Priprema: U plastičnu lađicu odvaži se 0,0541 g željezo (III)-klorida heksahidrata (Gram-mol, Hrvatska) i kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu volumena 10 mL i nadopuni do oznake s destiliranom vodom.

Glacijalna kiselina

Acetatni pufer, 0,3 M, pH 3,6

Priprema: 3,1 g natrij-acetat trihidrat (Kemika, Hrvatska) kvantitativno se prenese u odmjernu tikvicu od 1 L u koju se potom otpipetira 16 mL glacijalne kiseline (J. T. Baker, Njemačka) i nadopuni destiliranom vodom do oznake.

FRAP reagents

Priprema: u staklenu čašu od 50 mL pomiješa se 25 mL acetatnog pufera (0,3 M), 2,5 mL TPTZ reagensa (Sigma-aldrich) i 2,5 mL željezo (III)-klorida u omjeru 10:1:1.

Standard askorbinske kiseline (100 mg/L)

Priprema: 0,100 g askorbinske kiseline (Gram mol, Hrvatska) kvantitativno se prenese u odmjernu tikvicu od 100 mL i nadopuni do oznake s destiliranom vodom.

3.2.3.2. Postupak određivanja

Neposredno prije određivanja pripremljeni ekstrakt razrijedi se 125 puta koristeći otapalo za ekstrakciju (70 %-tni etanol).

U staklene epruvete redom se otpipetira 30 μL razrijeđenog ekstrakta i 2250 μL FRAP reagensa. Sadržaj epruveta promiješa se na Vortexu te termostatira 10 minuta pri 37 °C koristeći vodenu kupelj od rotavatora. Slijepa proba priprema se na isti način osim što se umjesto ekstrakta uzima ista količina otapalo u kojem je uzorak ekstrahiran (70 %-tni etanol). Apsorbancija se mjeri pri 593 nm.

3.2.3.3. Izrada baždarnog dijagrama

Korišteno je spektrofotometrijsko određivanje pomoću vanjskog standarda koji je u ovom slučaju standard askorbinske kiseline.

Izrada baždarnog dijagrama

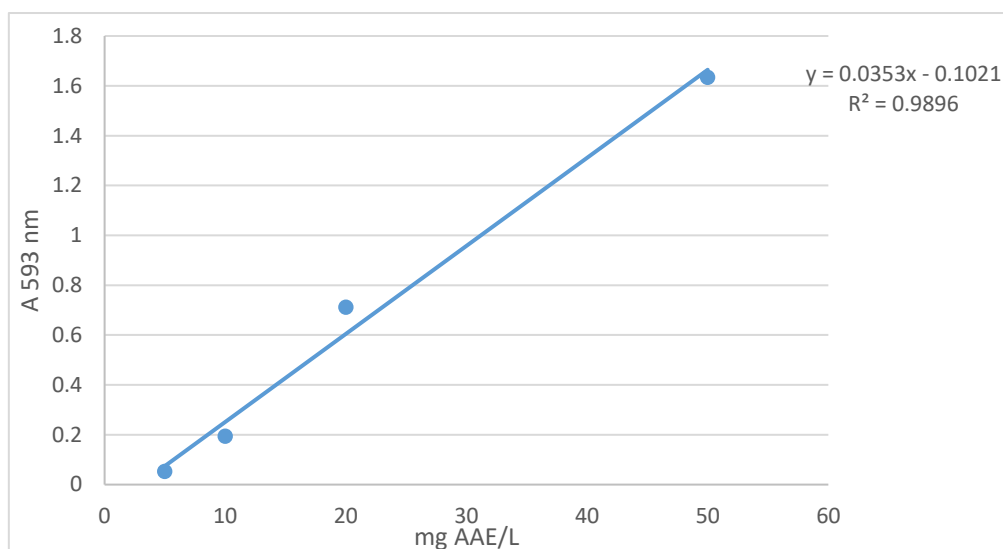
Od pripremljene otopine askorbinske kiseline (100 mg/L) u odmjerne tikvice pripreme se razrjeđenja u koncentracijama: 5, 10, 20 i 50 mg/L na način da se uzima alikvot od: 0,5, 1, 2 i 5 mL otopine askorbinske kiseline te se odmjerne tikvice nadopune destiliranom vodom do oznake.

U staklene epruvete redom se otpipetira 300 μL razrijeđene otopine standarda askorbinske kiseline i 2250 μL FRAP reagensa te se na Vortexu dobro promiješa. Sadržaj epruveta termostatira se 10 minuta na temperaturi 37 °C u vodenoj kupelji od rotavatora. Slijepa proba priprema se na isti način osim što se umjesto standarda askorbinske kiseline uzima ista količina destilirane vode. Apsorbancija se mjeri pri 593 nm, a dobivene vrijednosti prikazane su u tablici 5.

Tablica 5. Apsorbancija standardnih otopina askorbinske kiseline pri 593 nm

(mg/L)	A 593 nm
5	0,053
10	0,195
20	0,712
50	1,635

Baždarni pravac nacrtava se iz dobivenih vrijednosti apsorbancija pri 593 nm na osi ordinata i poznatih koncentracija standarda askorbinske kiseline na osi apscisa (prikazano slikom 5).



Slika 5. Baždarni dijagram za FRAP metodu

AA = *ascorbic acid*, askorbinska kiselina

Antioksidacijski kapacitet određen FRAP metodom izračuna se iz jednadžbe baždarnog pravca:

$$y = 0,0353 x - 0,1021$$

gdje je:

y – apsorbancija pri 593 nm,

x – ekvivalent askorbinske kiseline (AAE) (mg/L)

R² – koeficijent determinacije

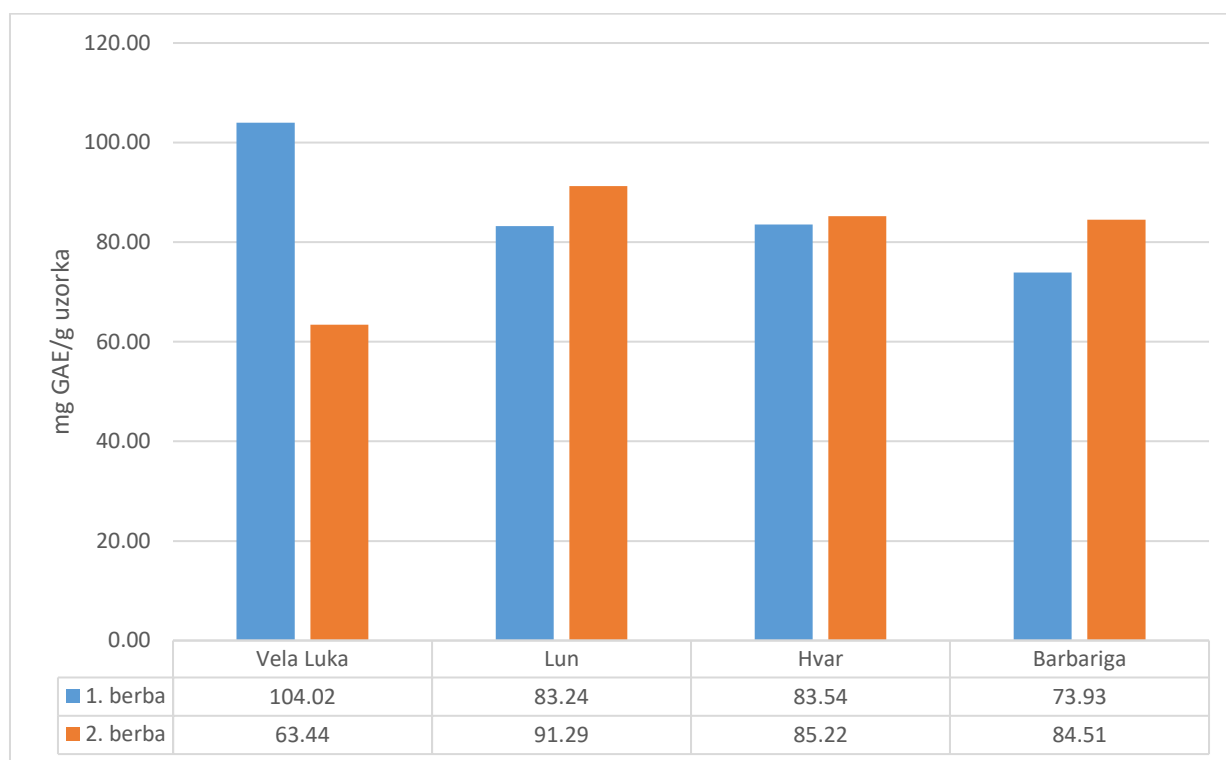
Budući da u oksidoreduktivnoj reakciji askorbinska kiselina može primiti dva elektrona, a za redukciju željeza Fe³⁺ u Fe²⁺ potreban je jedan elektron, dobivene ekvivalente askorbinske kiseline (AAE) potrebno je pomnožiti sa 2:

$$\text{FRAP} = \text{ekvivalent askorbinske kiseline (AAE)} \times 2$$

4. Rezultati i rasprava

Razlike u sastavu analiziranog lišća tršlje proizlaze iz razlika u njihovim staništima. Faktori poput sastava tla, saliniteta i promjene u temperaturi tijekom cijele godine izazivaju stres u biljci koja onda ovisno o prilagodljivosti pokazuje različitu toleranciju.

Na slici 6 prikazani su maseni udjeli ukupnih fenola u osušenim listovima tršlje koji su ubrani na četiri lokacije tijekom 2 termina berbe.



Slika 6. Udio ukupnih fenola u uzorcima tršlje sa četiri lokacije i dva termina berbe

GAE = *gallic acid equivalent* (ekvivalent galne kiseline)

Najveći maseni udio ukupnih fenola za prvi termin berbe određen je u listovima tršlje ubranim na području Vela Luke (104,02 mg GAE/g uzorka) dok u padajućem nizu slijede uzorci ubrani na Hvaru (83,54 mg GAE/g uzorka), Lunu (83,24 mg GAE/g uzorka) te Barbarigi (73,93 mg GAE/g uzorka). Udio ukupnih fenola u uzorcima iz Vela Luke u drugom terminu berbe (63,44 mg GAE/g uzorka) bio je značajno niži u usporedbi s 1. berbom i to za 39,01 %. Također, maseni udio ukupnih fenola u listovima tršlje s područja Vela Luke u 2. terminu berbe bio je najniži u usporedbi s ostalim lokacijama. Maseni udjeli ukupnih fenola na ostalim lokacijama u 2. terminu berbe bili su podjednaki i neznatno viši u usporedbi s

masenim udjelima ukupnih fenola u 1. terminu berbe. Razlike u masenim udjelima ukupnih fenola s obzirom na termine berbe nisu značajne odnosno nije uočena značajna razlika u udjelu ukupnih fenola u listovima tršlje ubranim u svibnju od onih u kolovozu. Do sličnog zaključka došli su Gardeli i suradnici (2008) pri čemu navode da se maseni udio ukupnih fenola u listovima tršlje ubranim u svibnju razlikuje za 0,012 % u odnosu na listove ubrane u kolovozu odnosno vrijednosti se značajno ne razlikuju.

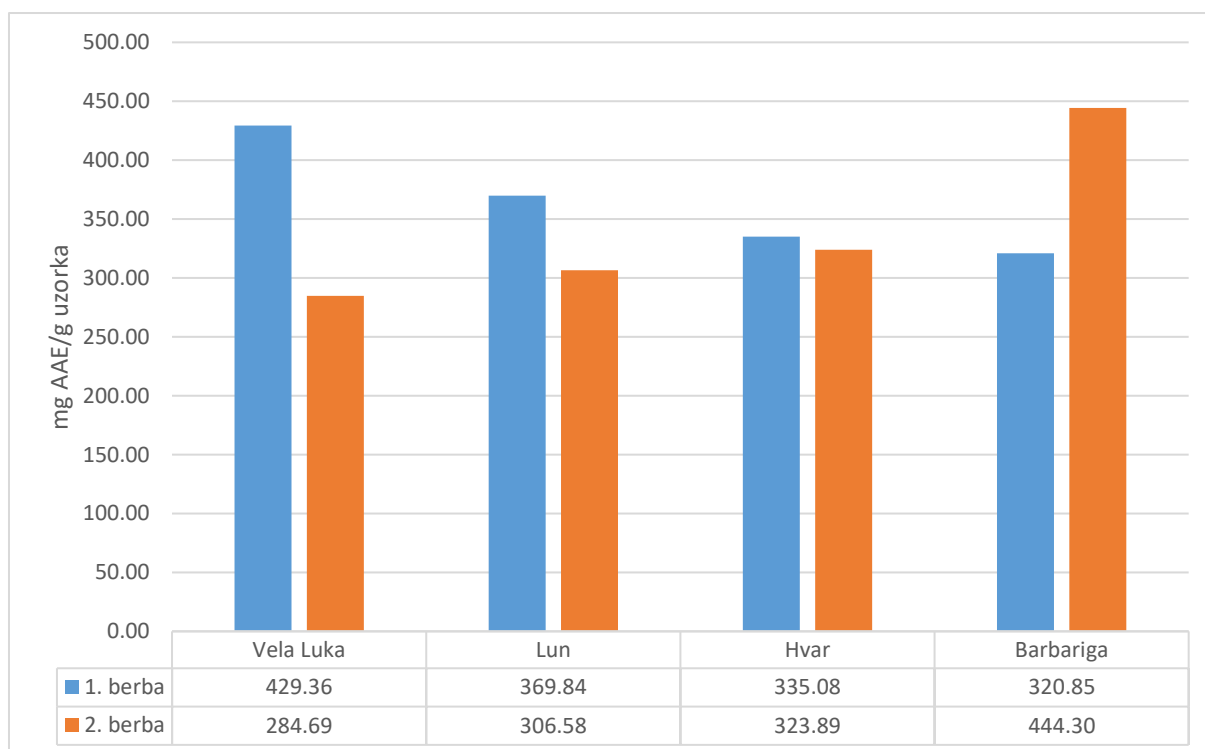
Missoun i suradnici (2017) proveli su određivanje udjela ukupnih fenola u listovima tršlje iz zapadnog Alžira te su u 80 %-tnom etanolnom ekstraktu dobili podjednake vrijednosti (114.95 ± 12 mg GAE/g suhe tvari) kao i u listovima tršlje s područja Vele Luke. Slične vrijednosti dobivene su analiziranjem lišća tršlje iz sjeveroistočnog Alžira ($142,76 \pm 19,98$ mg GAE/g suhe tvari) pri čemu je kao otapalo za ekstrakciju korišten 50 %-tni etanol, a sama ekstrakcija je bila potpomognuta ultrazvukom (20 kHz 15 minuta) (Dahmoune i sur., 2014).

S druge strane u listovima tršlje ubranim u Republici Hrvatskoj na četiri lokacije dobivene su značajno niže vrijednosti ukupnih fenola u usporedbi s listovima tršlje iz drugih podneblja. Tako su npr. Zitouni i suradnici (2016) u metanolnom ekstraktu lista tršlje iz sjeverozapadnog Alžira odredili udio ukupnih fenola $216,29 \pm 20,62$ mg GAE/g suhe tvari, a Gardeli i suradnici (2008) čak 588 mg GAE/g uzorka u listovima tršlje s otoka Zakynthos, Grčka. Značajno veći udio ukupnih fenola ($632,9 \pm 1,35$ mg GAE/g ekstrakta) određen je iz lišća tršlje iz područja sjevernog Alžira pri čemu je kao otapalo za ekstrakciju korišten 80 %-tni metanol (Cherbal i sur., 2012). Jedan od razloga većih masenih udjela ukupnih fenola u metanolnim ekstraktima listova tršlje osim zbog lokacije uzgoja može biti i u većem, odnosno boljem ekstrakcijskom kapacitetu primijenjenog otapala kao i samoj metodi ekstrakcije.

U prethodno navedenim istraživanjima autori su istaknuli utjecaj lokacije na udio ukupnih fenola. Uspoređujući ta istraživanja koja su provedena na biljkama ubranim u Alžiru, ali na različitim lokacijama potvrđuje se hipoteza o utjecaju lokacije na fitokemijski sastav biljke, pa time i udjel ukupnih fenola. U uzorcima tršlje ubranim u RH na većini lokacija dobivene su podjednake vrijednosti udjela ukupnih fenola iz čega proizlazi da okolišni uvjeti koji utječu na fitokemijski sastav biljke se drastično ne razlikuju od lokacije do lokacije. Izuzetak su uzorci iz Vela Luke što je mogući odraz njenog geografskog položaja odnosno njene južnije lokacije od preostalih tri. S obzirom na južniji geografski položaj moguće su varijacije u klimatskim uvjetima, sastavu tla i drugim okolišnim parametrima što naposljetku utječe na udio ukupnih fenola u biljci.

Osim što rezultati upućuju na mogući utjecaj lokacije rasta tršlje potrebno je razmotriti korištena otapala za ekstrakciju i provesti paralelnu studiju otapala u različitim koncentracijama radi utvrđivanja optimalnog otapala za postupak ekstrakcije bioaktivnih komponenata lišća tršlje.

Na slici 7 prikazane su vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta etanolnog ekstrakta lista tršlje i njihova usporedba s obzirom na lokaciju i vrijeme berbe. Najveći antioksidacijski kapacitet za prvu berbu pokazuje lišće ubrano sa područja Vele Luke (429,36 mg AAE/g uzorka), a najmanji antioksidacijski kapacitet pokazuje lišće s područja Barbarige (320,85 mg AAE/g uzorka). S druge strane najveći antioksidacijski kapacitet za drugi termin berbe pokazuje uzorak s Barbarige (444,30 mg AAE/g uzorka) što ga čini većim za 38,48 % od izmjerenog antioksidacijskog kapaciteta na istoj lokaciji u terminu prve berbe. Najmanji antioksidacijski kapacitet za drugi termin berbe pokazuje uzorak lišća s područja Vele Luke (284,69 mg AAE/g uzorka) te je u usporedbi s prvim terminom berbe manji za 33,69 % na istoj lokaciji. Također, antioksidacijski kapacitet određen u uzorku lišća tršlje iz drugog termina berbe sa područja Vele Luke bio je najmanji u usporedbi s vrijednostima s drugih lokacija. Pokazano je da je vrijeme berbe parametar koji značajno utječe na antioksidacijski kapacitet lišća tršlje. U uzorcima lišća iz kasnijeg termina berbe dobivene su niže vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta u usporedbi s vrijednostima za raniji termin berbe. Izuzetak su uzorci s Barbarige u kojima je određen rast antioksidacijskog kapaciteta s prijelazom iz svibnja u kolovoz. Dobar antioksidacijski kapacitet određen FRAP metodom za lišće ubrano u svibnju ($131,4 \pm 10,1$ mmol Fe^{2+}/L) i kolovozu ($105,0 \pm 12,2$ mmol Fe^{2+}/L) dobili su Gardeli i suradnici (2008) te je vidljivo da im vrijednosti također opadaju u kasnijem terminu berbe.

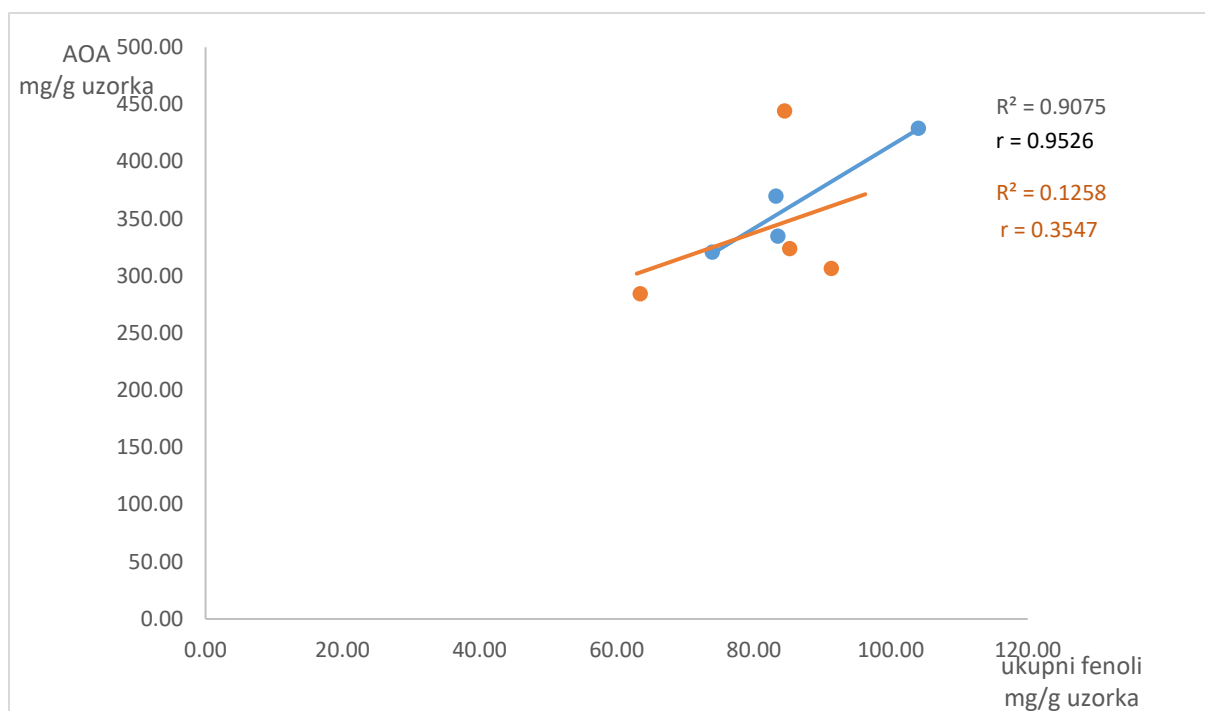


Slika 7. Antioksidacijski kapacitet ekstrakata lista tršlje s različitih lokacija iz dva termina berbe

AAE = *ascorbic acid equivalent*, ekvivalent askorbinske kiseline

S prijelazom iz stadija cvjetanja u svibnju do pune zrelosti u kolovozu rezultati ukazuju na mijenjanje fitokemijskog sastava biljke s gledišta antioksidacijskog kapaciteta. Budući da se udjeli fenolnih spojeva u uzorcima značajno ne mijenjaju, uočeni trend među rezultatima za antioksidacijsku aktivnost upućuje na moguću promjenu u fenolnom sastavu uzoraka tijekom vremena.

Rezultati upućuju na povezanost masenog udjela ukupnih fenola u lišću tršlje s njihovim antioksidacijskim kapacitetom. Slikom 8 prikazana je ovisnost antioksidacijskog kapaciteta o udjelu ukupnih fenola u uzorcima tršlje za prvu i drugu berbu te je izračunata njihova korelacija.



Slika 8. Ovisnost antioksidacijskog kapaciteta o udjelu ukupnih fenola u uzorcima tršlje za berbu 1 (plavo) i berbu 2 (narančasto)

AOA = antioksidacijska aktivnost

R^2 = koeficijent determinacije, r = koeficijent korelacije

Dobivena je vrlo dobra linearna korelacija za prvu berbu ($r = 0,9526$) dok je za drugu berbu korelacija slaba ($r = 0,3547$). Povećanje odnosno smanjenje udjela ukupnih fenola praćeno je istovremenim povećanjem odnosno smanjenjem antioksidacijskog kapaciteta što je dobro vidljivo uspoređujući vrijednosti za prvu i drugu berbu uzoraka s Vele Luke i Barbarige. Za uzorke s Hvara i Luna za prvi i drugi termin berbe vrijednosti masenih udjela ukupnih fenola značajno se ne razlikuju te se u istom trendu i njihovi antioksidacijski kapaciteti značajno ne mijenjaju.

Dobivena vrlo dobra korelacija antioksidacijskog kapaciteta s udjelom ukupnih fenola u listu tršlje upućuje na važnost te biljke kao prirodnog izvora antioksidansa. Stoga tršlja ima potencijalnu primjenu u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji. Potrebno je provesti daljnje analize radi identificiranja pojedinačnih fenolnih spojeva koji su prisutni u ekstraktu lista i njihove pojedinačne antioksidacijske aktivnosti kako bi se mogla utvrditi izvornost za pridodana svojstva.

Slaba korelacija za drugi termin berbe upućuje na prisutnost drugih spojeva koji su odgovorni za dobivene vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta, a ovim radom nisu obuhvaćeni.

Potrebne su daljnje analize jer odabrana metoda za određivanje ukupnih fenola (korištenje Folin Ciocalteu reagensa) je ograničena u svojoj točnosti iz razloga što analizirani ekstrakt nije bio pročišćen od potencijalnih interferenata (šećeri, amini) koji su mogli ući u reakciju s Folin Ciocalteu reagensom i doprinijeti intenzitetu plavog obojenja (odnosno izmjerenoj apsorbanciji) te na taj način utjecati na konačan rezultat. Također pokazano je da položaj hidroksilnih skupina može utjecati na ishod reakcije te da je reduktivna moć udvostručena kada su hidroksilne skupine pozicionirane u *ortho* i *para* položaju (Frankel i sur., 1995).

5. Zaključak

Maseni udio ukupnih fenola u lišću tršlje kretao se u rasponu od 63,44 mg GAE/g uzorka do 104,02 mg GAE/g uzorka.

Vrijeme berbe nije značajno utjecalo na maseni udio ukupnih fenola odnosno dobivene vrijednosti za berbu u svibnju značajno se ne razlikuju od onih za berbu u kolovozu. Izuzetak su uzorci prikupljeni sa područja Vele Luke na kojima je uočena najveća razlika u udjelu ukupnih fenola s obzirom na termin berbe tršlje.

Lokacija berbe za obalno područje RH nije se pokazala kao značajan faktor koji utječe na udio ukupnih fenola u lišću tršlje što dovodi do zaključka da su okolišni uvjeti (tip tla, temperatura, količina padalina) za ispitivana područja slični.

Neovisno o lokaciji berbe dobiven je značajan antioksidacijski kapacitet za sve uzorke. Antioksidacijska aktivnost određena FRAP metodom kretala se u rasponu od 306,58 mg AAE/g uzorka do 444,30 mg AAE/g uzorka što dovodi do zaključka da je tršlja značajan izvor antioksidansa.

Vrijeme berbe pokazao se kao faktor koji je utjecao na dobivene razlike u vrijednostima. Uzorci iz kasnijeg termina berbe pokazali su smanjenu antioksidacijsku aktivnost u usporedbi

s uzorcima iz ranijeg termina berbe. Izuzetak su uzorci prikupljeni s područja Barbarige u kojima je utvrđen rast antioksidacijskog kapaciteta u drugom terminu berbe s obzirom na prvi termin.

Dobivena je vrlo dobra korelacija masenog udjela ukupnih fenola sa antioksidacijskom aktivnošću za prvi termin berbe dok slaba korelacija za drugi termin berbe upućuje na prisutnost drugih spojeva koji nisu određeni u ovom radu, a zaslužni su za antioksidacijsku aktivnost lišća tršlje.

6. Literatura

Aiche I. G., Moualek I., Mestar G. N., Mezaache A. S., Zerroug M. M., Houali K. (2015) *In vitro* evaluation of biological activities of *Pistacia lentiscus* aqueous extract. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* **7**: 133 – 139.

Altemimi A., Lakhssassi N., Baharlouei A., Watcson D. G., Lighrfoot D. A. (2017) Phytochemicals: Extraction, Isolation, and Identification of Bioactive Compounds from Plant Extracts, < <http://www.mdpi.com/2223-7747/6/4/42>> . Pristupljeno: 15.04.2018.

Bachrouch O., Msaada K., Wannes W. A., Talou T., Ksouri R., Salem N., Abderraba M., Marzouk B. (2013) Variations in composition and antioxidant activity of Tunisian *Pistacia lentiscus* L. leaf essential oil. *Plant Biosystems* **149**: 38 – 47.

Botsaris G., Orphanides A., Yiannakou E., Gekas V., Goulas V. (2015) Antioxidant and Antimicrobial Effects of *Pistacia lentiscus* L. Extracts in Pork Sausages. *Food technology & Biotechnology* **53**: 472 – 478.

Bozorgi M., Memariani Z., Mobli M., Surmaghi M. H., Shams-Ardekani M. R., Rahimi R. (2013) Five *Pistacia* species (*P. vera*, *P. atlantica*, *P. terebinthus*, *P. khinjuk*, and *P. lentiscus*): A Review of Their Traditional Uses, Phytochemistry, and Pharmacology, < <https://www.hindawi.com/journals/tswj/2013/219815/>> . Pristupljeno: 24.03.2018.

Catalani S., Palma F., Battistelli S., Benedetti S. (2017) Oxidative stress and apoptosis induction in human thyroid carcinoma cells exposed to the essential oil from *Pistacia lentiscus* aerial parts, <<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0172138>> . Pristupljeno: 25.03.2018.

Chabert P., Auger C., Pincemail J., Schini-Kerth V. B. (2014) Overview of Plant-Derived Antioxidants. U: Systems Biology of Free Radicals and Antioxidants, 1. izd., Laher I., ur., Springer. str. 4005 – 4022.

Cherbal A., Kebieche M., Madani K., El-Adawi H. (2012) Extraction and Valorization of Phenolic Compounds of Leaves of Algerian *Pistacia lentiscus*. *Asian Journal of Plant Sciences* **11**: 131 – 136.

Cristiano G., Camposeo S., Fracchiolla M., Vivaldi G. A., De Lucia B., Cazzato E. (2016) Salinity Differentially Affects Growth and Ecophysiology of Two Mastic Tree (*Pistacia lentiscus* L.) Accessions. *Forests* **7**: 1 – 12.

Dahmoune F., Spigno G., Moussi K., Remini H., Cherbal A., Madani K. (2014) *Pistacia lentiscus* leaves as a source of phenolic compounds: Microwave-assisted extraction optimized and compared with ultrasound-assisted and conventional solvent extraction. *Industrial Crops and Products* **61**: 31 – 40.

Duračkova Z. (2014) Free Radicals and Antioxidants for Non-Experts. U: Systems Biology of Free Radicals and Antioxidants, 1. izd., Laher I., ur., Springer. str. 3 – 38.

Frankel E. N., Waterhouse A. L., Teissedre P. L. (1995) Principal phenolic phytochemicals in selected California wines and their antioxidant activity in inhibiting oxidation of human low-density lipoproteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **43**: 890 – 894.

Gardeli C., Papageorgiou V., Mallouchos A., Theodosis K., Komaitis M. (2008) Essential oil composition of *Pistacia lentiscus* L. and *Myrtus communis* L.: Evaluation of antioxidant capacity of methanolic extracts. *Food chemistry* **107**: 1120 – 1130.

Gramza-Michalowska A., Kmiecik D. (2016) Functional Aspects of Antioxidants in Traditional Food. U: Functional Properties of Traditional Foods, 1. izd., Kristbergsson K. i Otlés S., ur., Springer str. 3 – 5.

Hamiani A., Kambouche N., Bellahouel S. (2016) Chemical Composition and Antioxidant Potential of *Pistacia lentiscus* L. Essential Oil from Oran (Algeria). *Advances in Bioscience and Biotechnology* **7**: 539 – 544.

Ho C. T. (1992) Phenolic Compounds in Food. U: Phenolic Compounds in Food and Their Effects on Health, 1. izd., Ho C. T., Lee C., Huang M. T., ur., American Chemical Society str. 2 – 7.

Huang D., Ou B., Prior R. L. (2005) The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Food Chemistry* **53**: 1841 – 1856.

Khoddami A., Wilkes M. A., Roberts H. T. (2013) Techniques for Analysis of Plant Phenolic Compounds. *Molecules* **18**: 2328 – 2375.

Landau S., Muklada H., Markovics A., Azaizeh H. (2014) Traditional Uses of *Pistacia lentiscus* in Veterinary and Human Medicine. U: Medicinal and Aromatic Plants of the Middle-East, 2. izd., Yaniv Z. i Dudai N., ur., Springer. str. 163 – 180.

Llorens-Molina J. A., Gonzalez S. V., Martinez J. S. (2015) Essential oil composition of leaves of *Pistacia lentiscus* L. growing wild in Valencia (Spain). *Natural Volatiles & Essential Oils* **2**: 17 – 26.

Missoun F., Bouabedelli F., Benhamimed E., Baghdad A., Djebli N. (2017) Phytochemical study and antibacterial activity of different extracts of *Pistacia lentiscus* L. collected from Dahra region West of Algeria. *Journal of Fundamental and Applied Sciences* **9**: 669 – 684.

Mehenni C., Kilani D. A., Dumarcay S., Perrin D., Gerardin P., Atmani D. (2016) Hepatoprotective and antidiabetic effects of *Pistacia lentiscus* leaf and fruit extracts. *Journal of Food and Drug Analysis* **24**: 653 – 669.

Mokhtarpour A., Naserian A. A., Valizadeh R., Mesgaran Danesh M., Pourmollaw F. (2014) Extraction of Phenolic Compounds and Tannins from Pistachio By-products. *Annual Research & Review in Biology* **4**: 1330 – 1338.

Pisoschi A. M., Negulescu G. P. (2011) Methods for Total Antioxidant Activity Determination: A Review, <<https://www.omicsonline.org/methods-for-total-antioxidant-activity-determination-a-review-2161-1009.1000106.php?aid=3538>> . Pristupljeno: 29.05.2018.

Rodriguez-Perez C., Quirantes-Piné R., Amessis Ouchemoukh N., Madani K., Segura-Carretero A., Fernández-Gutierrez A. (2013) A metabolite-profiling approach allows the identification of new compounds from *Pistacia lentiscus* leaves. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **77**: 167 – 174.

Shahidi F. i Nacz M. (2004) Phenolics in Food and Nutraceuticals, 1. izd., Taylor & Francis. str. 1, 5, 11.

Yemmen M., Nguyen P. H., Ayadi M. T., Megraud F., Varon C. (2015) Antiproliferative and proapoptotic effects of leaf, fruit and stem extracts of *Pistacia lentiscus* on human colon and gastric cancer cell lines. *International journal of advances in Pharmacy, Biology and Chemistry* **4**: 737 – 745.

Zitouni A., Belyagoubi B. N., Ghembaza N., Toul F., Atik B. F. (2016) Assessment of Phytochemical Composition and Antioxidant Properties of Extracts from the Leaf, Stem, Fruit and Root of *Pistacia lentiscus* L.. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research* **8**: 627 – 633.

Izjava o izvornosti

Izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristila drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Jasna Žižić